



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 C12N 15/55, 9/20	A1	(11) 国際公開番号 WO 95/14783 (43) 国際公開日 1995年6月1日 (01.06.95)
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP94/01965</p> <p>(22) 国際出願日 1994年11月21日 (21. 11. 94)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平5/293631 1993年11月24日 (24. 11. 93) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 昭和電工株式会社 (SHOWA DENKO K.K.) [JP/JP] 〒105 東京都港区芝大門1丁目13番9号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者: および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 米田 正 (YONEDA, Tadashi) [JP/JP] 御代田喜昭 (MIYOTA, Yoshiaki) [JP/JP] 大野 桂 (OHNO, Kei) [JP/JP] 貴家潤治 (SASUGA, Junji) [JP/JP] 〒267 千葉県千葉市緑区大野台1丁目1番1号 昭和電工株式会社 総合研究所内 Chiba, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 大家邦久, 外 (OHIE, Kunihiisa et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町2丁目2番6号 堀口第2ビル7階 大家特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p>		添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title : LIPASE GENE AND VARIANT LIPASE

(54) 発明の名称 リパーゼ遺伝子及び変異体リパーゼ

(57) Abstract

A lipase gene isolated from a chromosome DNA of *Pseudomonas mendocina* SD702; a variant lipase gene obtained by the variation of the above gene; and a variant lipase coded for by the above variant gene and having physical or chemical properties changed thereby. The invention gene serves to facilitate production and modification of lipase LP or a variant lipase thereof. The modification of lipase LP permits production of a variant lipase that has a new amino acid sequence and is more suitable to industrial and other application than the lipase LP, thus providing a lipase useful in the fields of detergent, food processing, papermaking and so forth.

シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina) S D 7 0 2 株の染色体 DNA より単離されたリパーゼ遺伝子およびそれに変異を施して得られる変異体リパーゼ遺伝子並びにその変異体リパーゼ遺伝子にコードされ、物理的性質もしくは化学的性質の変化した変異体リパーゼ。

本発明の遺伝子により、リパーゼ L P もしくはその変異体リパーゼの生産および改変が容易となる。また、本発明によるリパーゼ L P の改変により、新規のアミノ酸配列を持ち、リパーゼ L P に比べて工業用等の用途により適合した変異体リパーゼを得ることができ、洗剤用、食品加工用、製紙工業用等の分野で有用なリパーゼを提供することができる。

情報としての用途のみ

P C T に基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁に P C T 加盟国を同定するために使用されるコード

AM	アルメニア	EE	エストニア	LK	スリランカ	RU	ロシア連邦
AT	オーストリア	ES	スペイン	LR	リベリア	SD	スーダン
AU	オーストラリア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SE	スウェーデン
BB	バルバドス	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SG	シンガポール
BE	ベルギー	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	SI	スロヴェニア
BF	ブルキナ・ファソ	GB	イギリス	MC	モナコ	SK	スロヴァキア共和国
BG	ブルガリア	GE	グルジア	MD	モルドバ	SN	セネガル
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	SZ	スワジランド
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	ML	マリ	TD	チャード
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	TG	トーゴ
CA	カナダ	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	TJ	タジキスタン
CF	中央アフリカ共和国	IS	アイスランド	MW	マラウイ	TM	トルクメニスタン
CG	コンゴ	IT	イタリア	MX	メキシコ	TT	トリニダード・トバゴ
CH	スイス	JP	日本	NE	ニジェール	UA	ウクライナ
CI	コート・ジボアール	KE	ケニア	NL	オランダ	UG	ウガンダ
CM	カメルーン	KG	キルギスタン	NO	ノルウェー	US	米国
CN	中国	KP	朝鮮民主主義人民共和国	NZ	ニュージーランド	UZ	ウズベキスタン共和国
CZ	チェッコ共和国	KR	大韓民国	PT	ポルトガル	VN	ヴェトナム

明細書

リパーゼ遺伝子及び変異体リパーゼ

5

技術分野

本発明は、洗剤、食品加工、製紙工業等の分野で有用な新規リパーゼをコードする遺伝子及びそのヌクレオチド配列、さらにそのリパーゼの物理的性質もしくは化学的性質を変化させる遺伝子の変異及びその変異遺伝子によりコードされる変異体リパーゼに関する。

10

背景技術

15

脂質分解酵素であるリパーゼは、乳製品のフレーバー形成のための食品加工用酵素、消化剤としての医療用酵素、血中脂質の測定のための診断用酵素、油脂の加水分解や改質、特に洗剤組成物の成分として脂質性の污垢を分解除去するための工業用酵素等として広範囲に使用されている。

20

リパーゼを生産する微生物としては、シュードモナス (Pseudomonas) 属、アルカリゲネス (Alcaligenes) 属、ムコール (Mucor) 属、カンディダ (Candida) 属、フミコーラ (Humicola) 属などが知られている。これらの中にはリパーゼ遺伝子が取得されているものがいくつかあるが、中でもシュードモナス (Pseudomonas) 属に属する微生物のリパーゼ遺伝子が数多く取得されている。これまでに知られているものとしては、シュードモナス・フラジ (Pseudomonas fragi) (特開昭62-228279、特開平2-39890)、シュードモナス・セパシア (Pseudomonas cepacia) (特開平3-87187、特開平3-47079)、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida)、シュードモナス・シュードアルカリゲネス

25

(Pseudomonas pseudoalcaligenes) (特開平3-500845)、シュードモナス・アエルギノサ (Pseudomonas aeruginosa) (J.Gen.Microbiol. (1992) 138, 1325-1335)、シュードモナス s p. (Pseudomonas sp.) 109 (J.Biol.Chem. (1991) 266, 18135-18140)、シュードモナス・グルマエ (Pseudomonas glumae) (Appl.Envir.Microbiol.(1992) 58, 12, 3787-3791) がある。

シュードモナス (Pseudomonas) 属細菌が分泌生産するリパーゼは、洗剤用、食品加工用、製紙工業用等の工業分野に用いられている。これらの分野で利用するリパーゼは、温度、pH、酸素、溶媒、圧力などの使用条件に対して安定であることが必要である。特に、洗剤に配合してその洗浄効果を高める洗剤補助剤としてのリパーゼには、アルカリ域でのpH、温度、酸素、酸化剤をはじめとする洗剤中の添加物に対して高い安定性が求められる。この様な化学的に安定な特性を得る方法として、酵素のアミノ酸配列を変えることが知られている。その例としては、特開平4-500608におけるプロテアーゼ及び酸化剤に対する改良などがある。

本出願人は、洗剤用等の工業分野に用いられる優れた特性を有し、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する新規リパーゼ（以下リパーゼLPと略記する。）を見出し、先に特許出願を行っている（特開平6-38746）。

発明の目的

本発明の目的は、上記リパーゼLPをコードする遺伝子及びそのヌクレオチド配列、及びリパーゼLPの物理的性質もしくは化学的性質を工業用等の用途により適したものに変化させた変異体リパーゼ、及び該変異体リパーゼをコードするようにヌクレオチド配列を変更した遺伝子を提供することにある。

発明の開示

本発明者等は、上記の目的を達成するために、まずリパーゼLPを生産するシュードモナス属細菌の1つであり、本出願人により日本国通商産業省工業技術院生命工学工業技術研究所(National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology)に寄託されているシュードモナス・メンドシナ(Pseudomonas mendocina)SD702株に由来するリパーゼ遺伝子を取得した。なお、シュードモナス・メンドシナ(Pseudomonas mendocina)SD702株は、1992年5月1日付で上記寄託機関に寄託されFERM P-12944なる受託番号が付与され、1993年5月12日付で上記寄託機関における「特許手続上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約」(BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PPROCEDURE)に基づく国際寄託に移管され、FERM BP-4291なる受託番号が付与されている。

更に、SD702株由来遺伝子の特異的な変異により、リパーゼLPのアミノ酸配列の1個以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異体リパーゼをコードするようにヌクレオチド配列が変更された遺伝子を取得した。この遺伝子を宿主菌に導入し、得られた形質転換体を培養した後、通常の分離方法により各種のリパーゼを得た。これらのリパーゼの中に、リパーゼLPの物理的性質もしくは化学的性質が変化し、洗剤用途等の工業用分野でより有用な変異体リパーゼが得られることを確認し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、

1) 配列番号1に記載されたリパーゼをコードする配列番号2に記載されたヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含む遺伝子、

2) 配列番号2に記載されたヌクレオチド配列の一部を含む前記1記載の遺伝子、

3) 遺伝子が、配列番号2に記載されたヌクレオチド配列の全部を含むリパーゼ遺伝子である前記1記載の遺伝子、

5 4) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列のうち少なくとも一箇所のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換された変異体リパーゼ、

5) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有するアミノ酸配列における次の位置: 18、21、25、31、43、60、75、79、93、104、
10 107、125、142、145、148、155、156、159、
164、183、198、203、210、216、222、223、
224、242、246、247、257、266、267、276、
および292のうちの少なくとも一箇所のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された変異体リパーゼ、

15 6) 次の置換: Gly18Ala; Met21Leu; Asp25Leu; Asp25Arg; Asn31Asp; Asp43Asn; Ala60Val; Ile75Leu; Gly79Pro; Thr93Val; Val104Ile; Val107Ala; Gly125Gln; Ile142Leu; Gly145Ser; Thr148Ala; Gly155Ser; Ser156Gly; Thr159Gly; Ala164Ser; Phe183Tyr; Ser198Lys; Arg203Ser; Thr210Ser; Val216Phe; Leu222Ala; Leu223Phe; Met224Leu; Arg242Thr; Arg246His; Met247Leu; Met257Leu; Thr266Val; Leu267Phe; Asp276Ser; および Gly292Serのうちの少なくとも1つを含む前記5記載の変異体リ

20
25

パーゼ、

7) 前記4乃至6のいずれかに記載の変異体リパーゼをコードするヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含む遺伝子、

8) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列における次の位置：18、
21、25、31、43、60、75、79、93、104、107、
125、142、145、148、155、156、159、164、
183、198、203、210、216、222、223、224、
242、246、247、257、266、267、276、および2
92のうちの少なくとも1箇所のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置
換されたりパーゼをコードするように、配列番号2に記載されたヌクレ
オチド配列の対応する部位が変更された遺伝子、および

9) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列において次のアミノ酸残基
の置換：G l y 1 8 A l a ; M e t 2 1 L e u ; A s p 2 5 L e u ; A
s p 2 5 A r g ; A s n 3 1 A s p ; A s p 4 3 A s n ; A l a 6 0 V
a l ; I l e 7 5 L e u ; G l y 7 9 P r o ; T h r 9 3 V a l ; V a
l 1 0 4 I l e ; V a l 1 0 7 A l a ; G l y 1 2 5 G l n ; I l e 1
4 2 L e u ; G l y 1 4 5 S e r ; T h r 1 4 8 A l a ; G l y 1 5 5
S e r ; S e r 1 5 6 G l y ; T h r 1 5 9 G l y ; A l a 1 6 4 S e
r ; P h e 1 8 3 T y r ; S e r 1 9 8 L y s ; A r g 2 0 3 S e r ;
T h r 2 1 0 S e r ; V a l 2 1 6 P h e ; L e u 2 2 2 A l a ; L e
u 2 2 3 P h e ; M e t 2 2 4 L e u ; A r g 2 4 2 T h r ; A r g 2
4 6 H i s ; M e t 2 4 7 L e u ; M e t 2 5 7 L e u ; T h r 2 6 6
V a l ; L e u 2 6 7 P h e ; A s p 2 7 6 S e r ; および G l y 2 9
2 S e r のうちの少なくとも1つがなされたりパーゼをコードするよう
に、配列番号2に記載されたヌクレオチド配列の対応する部位が変更さ
れた前記に記載の遺伝子を提供するものである。

図面の簡単な説明

図1は、プラスミドp S D L 2 3の制限酵素地図を示す。図中の矢印は、リパーゼの構造遺伝子の位置を示す。

5

発明の詳細な説明

請求の範囲および明細書において、アミノ酸の置換およびアミノ酸が置換された変異体リパーゼは次のように表される。すなわち、変異によって置換される元のアミノ酸残基の名称（3文字表記）、アミノ酸配列内の置換される位置、置換された後のアミノ酸残基の名称（3文字表記）の順に表記することにより示される。例えば、18の位置のグリシンがアラニンで置換された突然変異体は、G l y 1 8 A l aと表記される。

10

本発明において、リパーゼをコードする遺伝子は、コロニーハイブリダイゼーション法や平板培地上でのクリアゾーンの形成法等の公知の方法で染色体DNAから単離することができる。

15

すなわち、コロニーハイブリダイゼーション法では、まず染色体DNAライブラリーを作製する。次に、リパーゼの全部または一部のアミノ酸配列が判っている場合は、相同なオリゴヌクレオチドプローブを作製し、それを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行うことにより、リパーゼをコードする遺伝子を単離することができる。

20

あるいは、クリアゾーンの形成法では、リパーゼを産生しない細菌で染色体DNAライブラリーを作製し、リパーゼの基質を含む寒天上で平板培養する。リパーゼ遺伝子を含む染色体DNA断片を持つ細菌は、そのコロニーの回りに、リパーゼが基質を分解するために生じるクリアゾーンを形成するので、それを利用してリパーゼをコードする遺伝子を単離することができる。

25

本発明において、配列番号1に記載されたリパーゼLPのアミノ酸配

図面の簡単な説明

図1は、プラスミドp S D L 2 3の制限酵素地図を示す。図中の矢印は、リパーゼの構造遺伝子の位置を示す。

発明の詳細な説明

請求の範囲および明細書において、アミノ酸の置換およびアミノ酸が置換された変異体リパーゼは次のように表される。すなわち、変異によって置換される元のアミノ酸残基の名称（3文字表記）、アミノ酸配列内の置換される位置、置換された後のアミノ酸残基の名称（3文字表記）の順に表記することにより示される。例えば、18の位置のグリシンがアラニンで置換された突然変異体は、G l y 1 8 A l aと表記される。

本発明において、リパーゼをコードする遺伝子は、コロニーハイブリダイゼーション法や平板培地上でのクリアゾーンの形成法等の公知の方法で染色体DNAから単離することができる。

すなわち、コロニーハイブリダイゼーション法では、まず染色体DNAライブラリーを作製する。次に、リパーゼの全部または一部のアミノ酸配列が判っている場合は、相同なオリゴヌクレオチドプローブを作製し、それを用いてコロニーハイブリダイゼーションを行うことにより、リパーゼをコードする遺伝子を単離することができる。

あるいは、クリアゾーンの形成法では、リパーゼを産生しない細菌で染色体DNAライブラリーを作製し、リパーゼの基質を含む寒天上で平板培養する。リパーゼ遺伝子を含む染色体DNA断片を持つ細菌は、そのコロニーの回りに、リパーゼが基質を分解するために生じるクリアゾーンを形成するので、それを利用してリパーゼをコードする遺伝子を単離することができる。

本発明において、配列番号1に記載されたリパーゼLPのアミノ酸配

列もしくはそのアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有するアミノ酸配列の、1個以上のアミノ酸を他のアミノ酸に置換した変異体リパーゼをコードするようにヌクレオチド配列が変更された遺伝子を得る方法としては、リパーゼLPをコードするヌクレオチド配列を含む遺
5 伝子に、リパーゼLPのアミノ酸配列中の目的とする部位のアミノ酸の置換を起こすようなヌクレオチド配列の変異を起こすことができるものであれば如何なる方法を用いてもよい。

かかる変異を高頻度で起こさせる方法の一つに、部位特異的変異法がある。部位特異的変異法とは野生型酵素遺伝子を鋳型にして、変異目的
10 部位に塩基置換を有する合成オリゴヌクレオチドを変異源とする方法(M. J. Zoller, M. Smith, "Method in Enzymology" vol. 100, R. Wu, L. Grossmann, K. Moldave ed., P468, Academic Press (1983))であり、クンケル(Kunkel)法(Kunkel, T. A. (1985) Proc. Natl. Acad. USA., 82, 488)やギャップド・デュプレックス(Gapped duplex)法(Karmer, W.
15 et al (1984) Nucl. Acids Res., 12, 9441)などの改良法がある。またポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)を用いる方法(Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H., (1986) Cold Spring Harbor Symp. 51:263)などもある。

また、前記変異を起こさせる別の方法として、変異目的部位を特に定
20 めずにアミノ酸の置換を起こすランダム変異法がある。これにはいくつかの方法が知られている。例えば、リパーゼ遺伝子を組み込んだプラスミドを大腸菌の突然変異誘発株に導入する方法がある。また、例えば、マグネシウムイオン、マンガンイオン等の存在下でポリメラーゼ・チェーン・リアクション(PCR)反応を行う方法(Zhou, Y., Zhang, X.
25 , Ebright, R. H. (1991) Nucleic Acid Research 19, 6052, Tindall, K. R., Kunkel, T. A. (1988) Biochemistry 27, 6008-6013)や、修復機能の

ないDNAポリメラーゼを用いてDNA増幅反応を行う方法 (Liao, X., Wise, J. A. (1990) Gene 107-111) がある。

更に、例えば亜硝酸、ギ酸、ヒドラジン等の突然変異誘発剤を用いる方法 (Myers, R. M., Lerman, L. S., Maniatis, T. (1985) Science 229, 242-247) などがある。変異を起こさせる方法はこれらに限られず他の如何なる方法を用いてもよい。例えば、天然または人工的に紫外線などの突然変異により、所望の変異が起こった菌株から本発明に係る遺伝子を得る方法も考えられる。

変異のための鋳型としては、リパーゼ遺伝子を、例えばpUC系のような大腸菌のベクターに組み込んだものを用いることができる。上記のようにして得た変異体リパーゼ遺伝子を宿主菌に導入する。例えば、シュドモナス (Pseudomonas) 属細菌を宿主として用いる場合、RSF1010等の広宿主域プラスミド等を用いて染色体外に安定に維持させる方法、宿主菌内で複製できない形の遺伝子を用いて染色体内に組み込む方法等がある。

シュドモナス (Pseudomonas) 属細菌を宿主として用いた場合、変異体リパーゼは培養液中に分泌される。培養液からの変異体リパーゼの分離精製は常法に従って行うことができる。例えば、培養液に硫酸を加え、変異型リパーゼを粗分画し、透析によって硫酸を除去後、CMセルロースカラムで分別することによりSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一なバンドになるまで変異体リパーゼを精製する。変異体リパーゼの生産、および精製法は、上記方法に限定されるものではなく、他の方法でも勿論可能である。

本発明の変異体リパーゼはその物理的性質もしくは化学的性質が変化することにより、構造が安定化し、かつ／または機能が強化され、熱安定性や比活性などの性質を向上させることができる。

構造の安定化は、構造内部の疎水的相互作用を強める方向、表層の正の荷電を減ずる方向、二次構造を安定化する方向、ループ構造を安定化する方向へアミノ酸残基を変化させることにより達成される。

5 構造の安定化に好ましいアミノ酸配列の位置は、18、31、60、79、93、104、125、145、155、164、183、203、216、223、242、246、267、292である。

好ましい置換の具体例としては、Gly18Ala; Asn31Asp; Ala60Val; Gly79Pro; Thr93Val; Val104Ile; Gly125Gln; Gly145Ser; Gly155Ser; Ala164Ser; Phe183Tyr; Arg203Ser; Val216Phe; Leu223Phe; Arg242Thr; Arg246His; Leu267Phe, Gly292Serの置換
10 のうち少なくとも1つがなされているものが挙げられる。

また、機能の強化は、活性中心付近の正の荷電を増やす方向、アミノ酸残基の崇高さを減ずる方向、ループ構造の修飾を防ぐ方向、ループ構造の構造状の相互作用を減ずる方向へアミノ酸残基を変化させることにより達成される。
15

機能の強化に好ましいアミノ酸配列の位置は、21、25、43、75、107、142、148、156、159、198、210、222、224、247、257、266、276である。
20

好ましい置換の具体例としては、Met21Leu; Asp25Leu; Asp25Arg; Asp43Asn; Ile75Leu; Val107Ala; Ile142Leu; Thr148Ala; Ser156Gly; Thr159Gly; Ser198Lys; Thr210Ser; Leu222Ala; Met224Leu; Met247Leu; Met257Leu; Thr266Val; Asp276Serの置換
25

のうち少なくとも1つがなされているものが挙げられる。

5 なお、上記のアミノ酸残基の置換を、配列番号1に記載のアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を示すアミノ酸配列を有するリパーゼに適用する場合、その置換する位置は、2つのアミノ酸配列の相同性が最大になるように必要に応じて欠損位置を与えつつ、配列番号1に記載のアミノ酸配列と相同性を有する該リパーゼのアミノ酸配列を並置した場合に対応する位置を、配列番号1に記載のアミノ酸位置にて表したものである。

10 発明を実施するための最良の形態

本発明を実施例を挙げて説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例1：染色体DNAの調製

15 シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina) S D 7 0 2 株をL培地（ポリペプトン1%、酵母エキス0.5%、塩化ナトリウム0.5%）30mlに植菌し、37℃で1晩培養後、遠心分離によって上清を除去し、菌体を得た。これを0.4M塩化ナトリウム、10mM EDTAを含む50mMトリス塩酸緩衝液（pH8）5mlに懸濁した。これにリゾチーム2.5mgとRNaseA0.25mgを加え、37℃で
20 30分間穏やかに振とうし、溶菌させた。その後、60℃で10分間加温し、完全に可溶化させた。この溶液にTE緩衝液（1mM EDTAを含む10mMトリス塩酸緩衝液（pH8））で飽和させたフェノールを等量加え、穏やかに転倒混和し、遠心分離によって上層の水層を回収することを3回繰り返した。3回目に回収した水層に-20℃に冷やしたエタノールを2倍量加え、沈澱をプラスチック棒で巻取った。この沈
25 澱をエタノールでリンスした後、減圧乾燥し、TE緩衝液0.5mlに再

溶解した。

実施例 2 : 染色体 DNA ライブラリーの作製

染色体 DNA を制限酵素 *EcoRI* で部分分解した後、フェノール・クロロホルム抽出、エタノール沈澱により DNA 断片を回収した。一方、
5 コスミド pWE15 を同様に *EcoRI* で分解し、アルカリホスファターゼ処理を行った。両者を T4 DNA リガーゼを用いて連結した。これをファージ粒子にパッケージングした。このファージを、マルトース、硫酸マグネシウムを含む L 培地で培養した大腸菌培養液 600 μ l に加え、37℃で15分間インキュベートした後、L 培地を 1 ml になるように加え、37℃で1時間インキュベートした。これをアンピシリン
10 50 ppm を含む L 平板培地 (L 培地をアガロース 1.5% で固めたもの) に塗布し、37℃で1晩培養した。この結果、約1000コロニーの形質転換体を得た。

実施例 3 : オリゴヌクレオチドプローブの作製

15 精製したリパーゼの N 末端アミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーで分析し、配列番号 3 に示す結果を得た。これに基づいて配列番号 4 で示すオリゴヌクレオチドプローブを DNA 合成機で合成した。これに、 γ -³²P-ATP および T4 ポリヌクレオチドキナーゼを加え、37℃で1時間反応させ、放射能標識した。

20 実施例 4 : リパーゼをコードする遺伝子の単離

約1000コロニーの形質転換体を L 平板培地上に置いたニトロセルロースフィルター上で37℃で1晩培養した。フィルターを剥し、0.5M 水酸化ナトリウム / 1.5M 塩化ナトリウム溶液に浸したろ紙上で10分間溶菌させ、1.5M 塩化ナトリウム、1M トリス塩酸緩衝液 (pH 7) で
25 浸したろ紙上で7分間、2回中和した。フィルターを80℃で2時間焼成し、0.5% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) / 6×SSC (1×S

SCは、150 mM塩化ナトリウム／15 mMクエン酸ナトリウム溶液。
n×SSCは1×SSCのn倍の濃度の塩化ナトリウム／クエン酸ナトリウム溶液を意味する。) 中で菌の残査を洗浄した。0.1%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) / 5×デンハルト溶液 (Denhardt's solution)
5 (0.1 % ficoll、0.1 %ポリビニルピロリドン、0.1 % BSA) / 5×SSC中でフィルターのプレハイブリダイゼーションを37℃で1時間行った。同様の溶液中に上記の放射能標識したオリゴヌクレオチドプローブを加え、フィルターのハイブリダイゼーションを37℃で1晩行った。その後、フィルターを4×SSCで10分間、2×SSCで
10 20分間2回、1×SSCで20分間2回洗浄した。

このようなコロニーハイブリダイゼーションの結果、いくつかの陽性コロニーを得た。得られたコロニーのうちの1つからコスミドを回収し、EcoRIで分解した断片をアガロース電気泳動で分離し、ニトロセル
15 ロースフィルターに吸着させた。コロニーハイブリダイゼーションと同様の手順でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、18 kbpの断片にハイブリダイズした。

この断片を回収し、プラスミドpUC119のEcoRI部位に連結し、大腸菌JM101を形質転換した。このプラスミドを回収し、制限
20 酵素SacIで分解し、同様の手順でサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、2.3 kbpの断片を得た。

実施例5：リパーゼ遺伝子のヌクレオチド配列決定

実施例4で得た2.3 kbpの断片をpUC119のSacI部位に連結し、大腸菌JM101を形質転換した。このプラスミドをpSDL2
3と命名した。プラスミドpSDL23の制限酵素地図を図1に示す。
25 このプラスミドを用いて、サンガーのジデオキシ法 (Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 74, 5463)

でリパーゼ遺伝子DNAのヌクレオチド配列を決定した。すなわち、ABI社のダイデオキシターミネーター・シーケンシング・キットを用い、DNAシーケンサーによってヌクレオチド配列を解析した。その結果、配列番号2のようなリパーゼをコードするヌクレオチド配列を得た。この配列から推定されるアミノ酸配列を配列番号1で示す。

実施例6：部位特異的変異による突然変異体リパーゼ遺伝子の構築

リパーゼのアミノ酸残基を部位特異的に置換した変異体（A1a60ValもしくはLeu223Phe）の遺伝子を以下のように構築した。

部分特異的にアミノ酸を変換するため、配列番号5および配列番号6に示すオリゴヌクレオチドを化学合成し、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて5'末端をリン酸化して用いた。一方、変異の鋳型は、プラスミドpSDL23（図1）を用いた。pSDL23を用いて大腸菌BW313株（HfrKL16PO/45 [lysA(61-62)], dut1, nug1, thy-1, relA1）を形質転換し、この形質転換体から、メッシングらの方法（Viera, J. and Messing, J. (1987) Method in Enzymology, 153, 3-11）に従い1本鎖DNAを調製し、DNA中のデオキシチミンの一部がデオキシウラシルに置き換わった一本鎖DNAを得、これを鋳型として用いた。

上記のように調製した変異源オリゴヌクレオチドおよび鋳型DNAをアニーリングバッファー（20mMトリス塩酸緩衝液（pH8）、10mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウム、1mM DTT）中で混合し、65℃で15分静置後、37℃で15分静置し、変異源オリゴヌクレオチドを変異の目的部位にアニーリングさせた。

次に、このDNA混合液に2.5倍量のエクステンションバッファー（50mM TrisHCl, pH8.0、60mM CH₃COONH₄、5mM MgCl₂、5mM DTT、1mM NAD、0.5mM

dATP、0.5 mM dCTP、0.5 mM dGTP、0.5 mM dTTP)を加え、さらにE. coli DNAリガーゼとT4 DNAポリメラーゼを加えて25℃で2時間静置して相補鎖の合成を行った。その後、このDNAを用いて大腸菌BMH71-18 mutSを形質転換し、アンピシリン耐性のコロニーを選択した。上記形質転換体の数個からプラスミドDNAを調製し、実施例5と同様にジデオキシ法によりヌクレオチド配列を決定し、目的のアミノ酸残基に対応するコドンに変換していることを確認した。

上記のように作製したプラスミドをSacIで完全に分解後、変異体リパーゼ遺伝子部分を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で分画し、アガロースゲル中より抽出精製した。広宿主域ベクターであるpMFY42をSacIで完全に分解後、上記のように精製した変異体リパーゼ遺伝子部分を含むDNA断片と混合し、T4 DNAリガーゼによって連結反応を行い、大腸菌JM101株を形質転換し、カナマイシン耐性のコロニーを選択した。これらの形質転換体よりプラスミドDNAを抽出、精製、分析し、pMFY42のSacI切断部位に変異体リパーゼ遺伝子を含むSacI DNA断片が挿入されたプラスミドを得た。

実施例7：リパーゼの調製

実施例6で得た変異体リパーゼ遺伝子を含むプラスミドもしくは野生型リパーゼ遺伝子を含むプラスミドを用い、リパーゼ欠損株であるLD9株(シュードモナス・メンドシナ (*Pseudomonas mendocina*) SD702株にN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジンを作用させ、リパーゼ基質を含む平板培地にまいて培養し、クリアゾーンを形成しない株を選択することにより取得した変異株)をエレクトロポレーション法により形質転換し、カナマイシン耐性のコロニーを選択した。

すなわち、まずLD9株をL培地5mlでOD=0.7まで生育させた

後、遠心分離により菌体を回収した。この菌体を滅菌水に懸濁し、再び回収した後、 $500\mu\text{l}$ の滅菌水に再懸濁した。この菌懸濁液にプラスミドDNAを加え、電極付き 4mm セルに移した後、バイオラッド (BIORAD) 社製ジーン・パルサー・エレクトロポレーション・システム (Gene Pulser electroporation system) により高電圧電気パルス (電圧 2.5kV , 電気容量 $25\mu\text{F}$, 抵抗 1000Ω) を与えた。その後、菌懸濁液にL培地を 1ml 加え、 37°C で1時間振とう培養した後、カナマイシン 20ppm およびリパーゼの基質であるオリーブオイルのエマルジョンを含むL平板培地に塗布した。 37°C で1晩培養し、生育したコロニーのうち、コロニーの回りにクリアゾーンを形成したものを選抜し、形質転換株を得た。

この形質転換株を、ツイーン (Tween) 80を1%含有し、炭酸ナトリウムでpH9に調整したリパーゼ生産培地 300ml 中で 35°C 、14時間振とう培養し、培地中に変異体リパーゼを分泌生産させた。この培養液を遠心分離し、上清をとり、粗酵素液を調製した。これを硫酸分画し、透析によって硫酸を除去後、CMセルロースカラムにて処理し、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動で単一のバンドになるまで精製した。

実施例8：変異体リパーゼの比活性

実施例7で精製した部位特異的変異による変異体リパーゼの分子数を 280nm の吸収で一定にして活性を測定し、野生型リパーゼと比較した。活性測定は以下の方法により行った。

p-ニトロフェニルパルミテート (以下pNPPと略す) を $2\text{mg}/\text{ml}$ になるようにイソプロピルアルコールに溶かす。このpNPP溶液と 100mM ビスニン緩衝液 (Bicine buffer) (pH 8.0) を1:10の割合で混ぜ、基質溶液とする。基質溶液 $500\mu\text{l}$ に酵素液 $20\mu\text{l}$

を加え、室温で1～10分間反応させた後、1N塩酸を200 μ l加えて反応を止め、分光光度計で405nmの吸光度を測定する。

野生型の酵素の活性を100としたときの比活性の値を表1に示す。

実施例9：変異体リパーゼの熱安定性

- 5 野生型リパーゼと、上記で調製した部位特異的変異による変異体（Ala 60 ValおよびLeu 223 Phe）リパーゼの熱安定性を以下のように測定した。同活性値量の、変異体リパーゼ液および野生型リパーゼ液を50mMほう酸バッファー（pH10）中、60℃で10分間保温した後、リパーゼ活性を測定した。野生型の酵素の熱処理前の活性
- 10 性を100としたときの結果を表1に示す。

表 1

15	酵 素	比活性	熱安定性
	野生型	100	51
	Ala 60 Val	98	59
	Leu 223 Phe	64	84

発明の効果

- 20 本発明の遺伝子により、本発明に関わるリパーゼ、すなわち野生型リパーゼLPもしくはその変異体リパーゼの生産および改変が容易となる。

- また、本発明によるリパーゼLPの改変により、新規のアミノ酸配列を持ち、リパーゼLPに比べて、例えば熱安定性もしくは比活性の上昇等、物理的性質もしくは化学的性質がその使用分野により適合するよう
- 25 変化した変異体リパーゼを得ることができ、洗剤用、食品加工用、製紙工業用等の工業分野で有用なリパーゼを提供することができる。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：293

5 配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

起源

生物名：シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina)

10 株名：SD702

配列

Ala Trp Phe Gly Ser Ser Gly Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val

1 5 10 15

Leu Gly His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Ile Leu Gly Val Asn Tyr

15 20 25 30

Trp Tyr Gly Ile Pro Ala Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Ser Val Tyr

35 40 45

Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Ala Arg Gly Glu Gln

50 55 60

20 Leu Leu Gln Gln Val Glu Asp Ile Val Ala Ile Ser Gly Lys Gly Lys

65 70 75 80

Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Thr Arg Tyr Val

85 90 95

Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Ser Val Gly Ala

25 100 105 110

Pro His Lys Gly Ser Ala Ala Ala Asp Phe Leu Lys Gly Ile Ser Asp

115 120 125

Gly Pro Ala Gly Pro Val Ala Thr Pro Leu Leu Ala Gly Ile Val Asn

130 135 140

Gly Leu Gly Thr Leu Ile Asn Phe Leu Ser Gly Ser Ser Ser Thr Thr
 145 150 155 160
 Pro Gln Asn Ala Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala
 165 170 175
 5 Ala Arg Phe Asn Ala Lys Phe Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys
 180 185 190
 Gly Glu Gly Ala Tyr Ser Val Asn Gly Val Arg Tyr Tyr Ser Trp Ser
 195 200 205
 Gly Thr Ser Pro Leu Thr Asn Val Leu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Met
 10 210 215 220
 Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Gly Ser Glu Ala Asn Asp Gly Leu Val
 225 230 235 240
 Gly Arg Cys Ser Ser Arg Met Gly Gln Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg
 245 250 255
 15 Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Thr Leu Gly Leu Thr Ser Leu
 260 265 270
 Phe Glu Thr Asp Pro Val Thr Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu
 275 280 285
 Lys Asn Ala Gly Leu
 20 290

配列番号 : 2

配列の長さ : 879

配列の型 : 核酸

25 鎖の数 : 二本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : Genomic DNA

起源

生物名 : シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina)

株名 : S D 7 0 2

配列の特徴

特徴を表す記号 : mat peptide

存在位置 : 1..879

5 特徴を決定した方法 : S

配列

	GCC TGG TTC GGC TCC TCC GGC TAC ACC CAG ACC AAG TAC CCC ATC GTC	48
	Ala Trp Phe Gly Ser Ser Gly Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val	
	1 5 10 15	
10	CTC GGC CAC GGC ATG CTC GGC TTC GAC AGC ATC CTC GGC GTC AAT TAC	96
	Leu Gly His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Ile Leu Gly Val Asn Tyr	
	20 25 30	
	TGG TAT GGC ATC CCG GCC GCC CTG CGC CGC GAC GGT GCC AGC GTC TAC	144
	Trp Tyr Gly Ile Pro Ala Ala Leu Arg Arg Asp Gly Ala Ser Val Tyr	
15	35 40 45	
	GTC ACC GAG GTC AGT CAG CTC GAT ACC TCC GAA GCG CGC GGC GAG CAG	192
	Val Thr Glu Val Ser Gln Leu Asp Thr Ser Glu Ala Arg Gly Glu Gln	
	50 55 60	
	TTG CTG CAG CAA GTC GAG GAT ATC GTC GCC ATC AGC GGC AAA GGC AAG	240
20	Leu Leu Gln Gln Val Glu Asp Ile Val Ala Ile Ser Gly Lys Gly Lys	
	65 70 75 80	
	GTC AAT CTG ATC GGC CAC AGC CAC GGC GGC CCC ACC ACG CGC TAC GTT	288
	Val Asn Leu Ile Gly His Ser His Gly Gly Pro Thr Thr Arg Tyr Val	
	85 90 95	
25	GCC GCC GTG CGG CCG GAC CTG GTC GCC TCG GTC ACC AGC GTC GGT GCA	336
	Ala Ala Val Arg Pro Asp Leu Val Ala Ser Val Thr Ser Val Gly Ala	
	100 105 110	
	CCG CAC AAG GGC TCG GCC GCT GCC GAC TTC CTC AAG GGC ATC AGC GAT	384
	Pro His Lys Gly Ser Ala Ala Ala Asp Phe Leu Lys Gly Ile Ser Asp	

	115	120	125	
	GGC CCC GCC GGG CCG GTC GCC ACA CCG CTG CTG GCG GGC ATC GTC AAC	432		
	Gly Pro Ala Gly Pro Val Ala Thr Pro Leu Leu Ala Gly Ile Val Asn			
	130	135	140	
5	GGC CTG GGC ACG CTG ATC AAC TTC CTC TCC GGC AGT TCC AGC ACC ACC	480		
	Gly Leu Gly Thr Leu Ile Asn Phe Leu Ser Gly Ser Ser Ser Thr Thr			
	145	150	155	160
	CCG CAG AAC GCC CTG GGT TCG CTG GAG TCG CTC AAC AGC GAA GGC GCC	528		
	Pro Gln Asn Ala Leu Gly Ser Leu Glu Ser Leu Asn Ser Glu Gly Ala			
10	165	170	175	
	GCG CGC TTC AAT GCC AAG TTC CCG CAG GGC ATC CCC ACC AGC GCC TGT	576		
	Ala Arg Phe Asn Ala Lys Phe Pro Gln Gly Ile Pro Thr Ser Ala Cys			
	180	185	190	
	GGC GAA GGG GCA TAC AGC GTG AAC GGC GTG CGC TAT TAC TCC TGG AGC	624		
15	Gly Glu Gly Ala Tyr Ser Val Asn Gly Val Arg Tyr Tyr Ser Trp Ser			
	195	200	205	
	GGC ACC AGC CCG CTG ACC AAC GTG CTC GAC CCC AGC GAC CTG CTG ATG	672		
	Gly Thr Ser Pro Leu Thr Asn Val Leu Asp Pro Ser Asp Leu Leu Met			
	210	215	220	
20	GGC GCC TCC TCG CTG ACC TTC GGC TCC GAG GCC AAC GAC GGC CTG GTC	720		
	Gly Ala Ser Ser Leu Thr Phe Gly Ser Glu Ala Asn Asp Gly Leu Val			
	225	230	235	240
	GGC CGC TGC AGT TCG CGC ATG GGC CAG GTG ATC CGC GAC AAC TAC CGG	768		
	Gly Arg Cys Ser Ser Arg Met Gly Gln Val Ile Arg Asp Asn Tyr Arg			
25	245	250	255	
	ATG AAC CAC CTC GAC GAG GTC AAC CAG ACC CTG GGG CTG ACC AGC CTG	816		
	Met Asn His Leu Asp Glu Val Asn Gln Thr Leu Gly Leu Thr Ser Leu			
	260	265	270	
	TTC GAG ACC GAT CCG GTG ACC GTC TAC CGT CAG CAC GCC AAC CGC CTG	864		

Phe Glu Thr Asp Pro Val Thr Val Tyr Arg Gln His Ala Asn Arg Leu

275

280

285

AAG AAC GCC GGG CTA

879

Lys Asn Ala Gly Leu

5

290

配列番号 : 3

配列の長さ : 30

生物名 : シュードモナス・メンドシナ (Pseudomonas mendocina)

10

株名 : S D 7 0 2

配列

Ala Trp Phe Gly Ser Ser Gly Tyr Thr Gln Thr Lys Tyr Pro Ile Val

1

5

10

15

Leu Gly His Gly Met Leu Gly Phe Asp Ser Ile Leu Gly Val

15

20

25

30

配列番号 : 4

配列の長さ : 20

配列の型 : 核酸

20

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : 他の核酸 合成DNA

配列

CACGGCATGC TCGGCTTCGA 20

25

配列番号 : 5

配列の長さ : 22

配列の型 : 核酸

鎖の数 : 一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

ACCTCCGAAG TCCGCGGCGA GC 22

5

配列番号：6

配列の長さ：29

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

10

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列

TCGACCCCAG CGATCTGTTC ATGGGCGCC 29

15

20

25

請求の範囲

- 1) 配列番号1に記載されたリパーゼをコードする配列番号2に記載されたヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含む遺伝子。
- 5 2) 配列番号2に記載されたヌクレオチド配列の一部を含む請求の範囲第1項記載の遺伝子。
- 3) 遺伝子が、配列番号2に記載されたヌクレオチド配列の全部を含むリパーゼ遺伝子である請求の範囲第1項記載の遺伝子。
- 4) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列のうち少なくとも一箇所の
10 アミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換された変異体リパーゼ。
- 5) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列と少なくとも50%以上の相同性を有するアミノ酸配列における次の位置：18、21、25、31、43、60、75、79、93、104、107、125、142、145、148、155、156、159、
15 164、183、198、203、210、216、222、223、224、242、246、247、257、266、267、276、および292のうちの少なくとも一箇所のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換された変異体リパーゼ。
- 6) 次の置換：G l y 1 8 A l a ; M e t 2 1 L e u ; A s p 2 5 L
20 e u ; A s p 2 5 A r g ; A s n 3 1 A s p ; A s p 4 3 A s n ; A l a 6 0 V a l ; I l e 7 5 L e u ; G l y 7 9 P r o ; T h r 9 3 V a l ; V a l 1 0 4 I l e ; V a l 1 0 7 A l a ; G l y 1 2 5 G l n ; I l e 1 4 2 L e u ; G l y 1 4 5 S e r ; T h r 1 4 8 A l a ; G l y 1 5 5 S e r ; S e r 1 5 6 G l y ; T h r 1 5 9 G l y ; A l a 1
25 6 4 S e r ; P h e 1 8 3 T y r ; S e r 1 9 8 L y s ; A r g 2 0 3 S e r ; T h r 2 1 0 S e r ; V a l 2 1 6 P h e ; L e u 2 2 2 A l

a ; L e u 2 2 3 P h e ; M e t 2 2 4 L e u ; A r g 2 4 2 T h r ;
A r g 2 4 6 H i s ; M e t 2 4 7 L e u ; M e t 2 5 7 L e u ; T h
r 2 6 6 V a l ; L e u 2 6 7 P h e ; A s p 2 7 6 S e r ; および G
l y 2 9 2 S e r のうちの少なくとも1つを含む請求の範囲第5項記載
5 の変異体リパーゼ。

7) 請求の範囲第4項乃至第6項のいずれかの項に記載の変異体リ
パーゼをコードするヌクレオチド配列の全部もしくは一部を含む遺伝子。

8) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列における次の位置: 18、
21、25、31、43、60、75、79、93、104、107、
10 125、142、145、148、155、156、159、164、
183、198、203、210、216、222、223、224、
242、246、247、257、266、267、276、または2
92のうちの少なくとも1箇所のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置
換されたりパーゼをコードするように、配列番号2に記載されたヌクレ
15 オチド配列の対応する部位が変更された遺伝子。

9) 配列番号1に記載されたアミノ酸配列において次のアミノ酸残基
の置換: G l y 1 8 A l a ; M e t 2 1 L e u ; A s p 2 5 L e u ; A
s p 2 5 A r g ; A s n 3 1 A s p ; A s p 4 3 A s n ; A l a 6 0 V
a l ; I l e 7 5 L e u ; G l y 7 9 P r o ; T h r 9 3 V a l ; V a
20 l 1 0 4 I l e ; V a l 1 0 7 A l a ; G l y 1 2 5 G l n ; I l e 1
4 2 L e u ; G l y 1 4 5 S e r ; T h r 1 4 8 A l a ; G l y 1 5 5
S e r ; S e r 1 5 6 G l y ; T h r 1 5 9 G l y ; A l a 1 6 4 S e
r ; P h e 1 8 3 T y r ; S e r 1 9 8 L y s ; A r g 2 0 3 S e r ;
T h r 2 1 0 S e r ; V a l 2 1 6 P h e ; L e u 2 2 2 A l a ; L e
25 u 2 2 3 P h e ; M e t 2 2 4 L e u ; A r g 2 4 2 T h r ; A r g 2
4 6 H i s ; M e t 2 4 7 L e u ; M e t 2 5 7 L e u ; T h r 2 6 6

V a l ; L e u 2 6 7 P h e ; A s p 2 7 6 S e r ; および G l y 2 9
2 S e r のうちの少なくとも1つがなされたリパーゼをコードするよう
に、配列番号2に記載されたヌクレオチド配列の対応する部位が変更さ
れた請求の範囲第8項に記載の遺伝子。

5

10

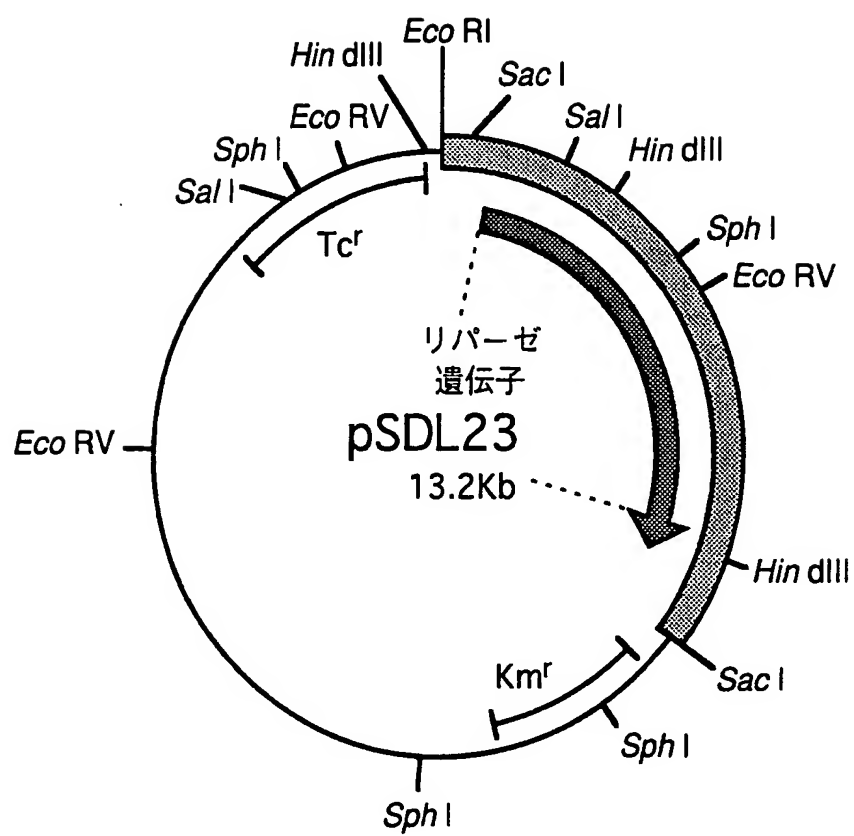
15

20

25

図 面

図 1



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/01965

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁶ C12N15/55, C12N9/20

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁶ C12N15/55, C12N9/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 6-38746 (Showa Denko K.K.), February 15, 1994 (15. 02. 94) & JP, A, 6-209772 & EP, A1, 571982 & CA, A, 2097000	1-9



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

January 27, 1995 (27. 01. 95)

Date of mailing of the international search report

February 14, 1995 (14. 02. 95)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Authorized officer

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/55, C12N9/20

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁶ C12N15/55, C12N9/20

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用了電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, A, 6-38746 (昭和電工株式会社), 15. 2月. 1994 (15. 02. 94) & JP, A, 6-209772 & EP, A1, 571982 & CA, A, 2097000	1-9

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日
若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献
(理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日
の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と
矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のため
に引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規
性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文
献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性
がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

27. 01. 95

国際調査報告の発送日

14.02.95

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

村上 騎見高

4 B 8 8 2 7

電話番号 03-3581-1101 内線

3448